

日 本 国 特 許 庁

03.03.00

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1 9 9 9 年 3 月 3 日

REC'D 25 APR 2000

出 願 番 号
Application Number:

平成 1 1 年 特 許 願 第 0 5 5 7 3 2 号

出 願 人
Applicant (s):

社団法人北里研究所

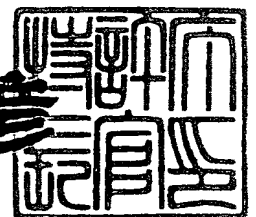
097914705

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 0 年 4 月 7 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 0 - 3 0 2 3 2 2 4

【書類名】 特許願

【整理番号】 K4-004

【提出日】 平成11年 3月 3日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 39/39

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都港区白金五丁目 9 番 1 号 社団法人北里研究所内

 【氏名】 山田 陽城

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都港区白金五丁目 9 番 1 号 社団法人北里研究所内

 【氏名】 清原 寛章

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都港区白金五丁目 9 番 1 号 社団法人北里研究所内

 【氏名】 永井 隆之

【特許出願人】

 【識別番号】 390027214

 【氏名又は名称】 社団法人 北里研究所

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

 【識別番号】 100108774

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 041092

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716335

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 脂肪酸を構成成分とするワクチン製剤

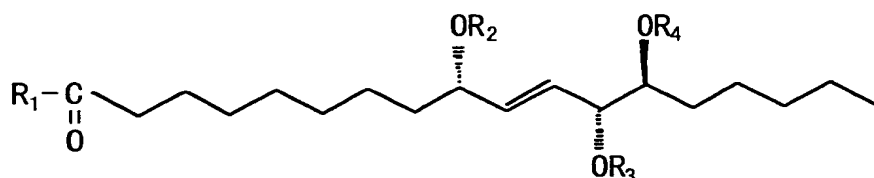
【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒドロキシ不飽和脂肪酸またはその誘導体を含むアジュバント。

【請求項 2】 ヒドロキシ不飽和脂肪酸またはその誘導体が、トリヒドロキシーモノエン構造を有する炭素数18の不飽和脂肪酸またはその誘導体である、請求項 1 に記載のアジュバント。

【請求項 3】 トリヒドロキシーモノエン構造を有する炭素数18の不飽和脂肪酸またはその誘導体が下記の構造で示される 9S, 12R, 13S-トリヒドロキシ-10E-オクタデセン酸 (9S, 12R, 13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid) またはその誘導体である、請求項 2 に記載のアジュバント。

【化 1】



[式中、R1 は水酸基、あるいは 1 個または 2 個のアルキル基またはアリール基が 1 個の酸素、硫黄、または窒素原子に結合した構造の置換基であり、R2、R3、および R4 は同一または異なってもよい水素、アルキル基、またはアシル基を示す。]

【請求項 4】 ヒドロキシ不飽和脂肪酸が生薬より調製したヒドロキシ不飽和脂肪酸またはその誘導体である、請求項 1～3 のいずれかに記載のアジュバント。

【請求項 5】 請求項 1～4 のいずれかに記載のアジュバントを構成成分とするワクチン製剤。

【請求項 6】 ワクチン製剤中のアジュバントが免疫抗原成分と別に経口接種に用いられる、請求項 5 に記載のワクチン製剤。

【請求項 7】 ワクチン製剤中の免疫抗原成分が経鼻接種に用いられる、請

求項 6 に記載のワクチン製剤。

【請求項 8】 免疫抗原成分として、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、おたふくかぜウイルス、エイズウイルス、百日せき菌、ジフテリア菌、ヘリコバクター・ピロリ菌、出血性大腸菌(EHEC)、クラミジア原虫、マイコプラズマ原虫、マラリア原虫、コクシジウム原虫、および住血吸虫で構成される群から選択される単一または複数の病原微生物の抗原を含む、請求項 5 から 7 のいずれかに記載のワクチン製剤。

【請求項 9】 ワクチン製剤中のアジュバントを免疫抗原成分と別に経口投与する、請求項 5 に記載のワクチン製剤の投与方法。

【請求項 10】 免疫抗原成分を経鼻投与する、請求項 9 に記載のワクチン製剤の投与方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒドロキシ不飽和脂肪酸を有効成分とするアジュバント、及びこれを構成成分とするヒトおよび動物の病気の予防または治療に有用なワクチン製剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

ワクチンは、種々の疾病の予防に用いられ、天然痘のような特定の疾患に対しては数々の輝かしい成果をあげてきた。しかしながら、ワクチンの副反応や、また効果が充分でないという例も多くあって、その改善が強く望まれている。現在、人体用または動物用に使用されているワクチンの多くは、病原体あるいは病原体の一部を取り出し、ワクチンの抗原材料として用いる。従って、病原体を構成する成分や病原体を増殖させる媒体の成分がワクチンに混入する可能性を否定できない。これはワクチン接種の際、望ましくない副反応を引き起こす原因となりうる。また、免疫賦与に働く抗原部位そのものも多量に接種されると副反応を誘発する場合もある。

【0003】

このようなことをできるだけ避け、安全性に優れたワクチンを製造または使用する方法として、ワクチンの接種量を減少させることや、ワクチン抗原の純度を高めること、接種ルートを変えることなどが行われている。しかし、一般的には、このような変更に伴いワクチンの免疫力が低下しやすい問題点がある。このような免疫力の低下を防ぐために、アジュバントを用いることが実施されてきた。しかし、ここでも、アジュバントの有効性と安全性の向上など、改善すべき課題が残っている。

【0004】

例えば、インフルエンザウイルスなど、多くの病原微生物は気道粘膜を介して感染するので、感染初期段階で罹患を阻止するためには、血中よりも粘膜での局所免疫を強力に誘発するワクチンが望ましい。このためにも局所免疫を誘発しやすくするアジュバントが求められている。一方、注射以外の接種ルートとして注目されるのが、経口接種、あるいは経鼻接種である。注射は医療技術者が行わなければならないので、例えば医療施設が完備されていない状況で多数の人にワクチン接種を進めるときには困難を伴いやすい。これに対して経口接種、あるいは経鼻接種では、ワクチン製剤さえ運搬すれば、専門家の指導の下に、直接の助けがなくとも接種が可能であると期待される。しかし、注射用ワクチンを別の接種ルートで接種すると一般的には十分な免疫刺激を得にくいため、やはり接種ルートに適したアジュバントが必要となる。

【0005】

すなわち、有効かつ安全で、必要な部位で免疫を誘発しやすくする優れたアジュバントを開発することは、ワクチン開発にとって重要な課題である。

【0006】

従来、ワクチンにはアジュバントとしてアルミニウム化合物（硫酸アルミニウム、水酸化アルミニウムなど）、リン酸化合物（リン酸カルシウム、リン酸アルミニウムなど）が広く用いられて来た。これらの化合物のゲルは、現在、人体用ワクチンに用い得るほとんど唯一のアジュバントである。しかし、これらのアジュバントにはいくつかの問題点があり、改善が求められている。それらを例示すれば、1）製法、及び取り扱い上の問題として、製造のロットごとに品質が異な

りやすいので、大量生産に不向きであり、加えてカラム操作に馴染みにくい等取り扱い上も不便である、2) 効果上の問題として、液性免疫の誘発力に優れているものの、細胞性免疫の誘発力が低いので、用いる抗原に限界がある、などが挙げられる。

【0007】

これらの改善を目的として、新しいアジュバントの研究、開発が進められている。それらを例示すれば次のものが挙げられる (J.C. Cox et al., Vaccine 15, 248 - 256, 1997)。

1. サポニン等、界面活性作用物質。
2. コレラトキシン等、細菌毒素。
3. BCG、ムラミルペプチド等、微生物または植物成分。
4. インターロイキンなど、サイトカイン類。
5. 合成ポリアニオン、ポリカチオンなど。
6. マイクロキャリアなど。

【0008】

本発明者らは、数種の生薬から構成されている漢方薬の抽出液のあるものがアジュバント作用を有し、経鼻接種したインフルエンザワクチンの構成成分として用いた場合、鼻腔洗液中および血清中でインフルエンザウイルスに対する抗体価を上昇させることを明らかにしてきた [H. Yamada and T. Nagai, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 20 (3), 185-192, 1998]。しかし、アジュバント作用が抽出液中のいかなる化合物によってもたらされているのかについては、未だに明らかにされていなかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、ワクチンの使用量を減らしたり接種ルートを変えても免疫力が低下しないようなワクチンを製造するため、ワクチンの免疫力を増強させる新しい方法を提供することにある。より具体的には、生薬中から、より単純な構造で有効性と安全性の高い化合物を見い出し、新規アジュバントとして開発することにある。漢方薬は中国、日本やアジア各国で長年の臨床使用を通じて有効性と

安全性が確立されているので、本課題の材料として優れて好適である。

【0010】

すなわち、本発明の課題は、効果と安全性の高い新規なアジュバントとして、ヒドロキシ不飽和脂肪酸およびその誘導体を提供し、かつ、これらを構成成分とするワクチンを提供し、有効で安全なワクチンの製造に貢献することである。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、8種の生薬から構成されている漢方薬「小青竜湯（しょうせいりゅうとう）」の熱水抽出液がアジュバント作用を有し、経鼻接種のインフルエンザワクチンとともに経口投与した場合、鼻腔洗液中および血清中でインフルエンザウイルスに対する抗体価を上昇させることを既に明らかにしている [H. Yamada and T. Nagai, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 20 (3), 185-192, 1998]。

【0012】

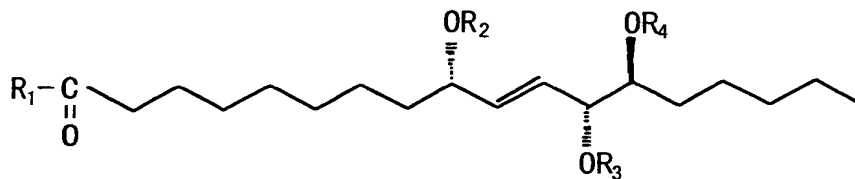
そこで本発明者らは、上記課題の達成を目的として、小青竜湯を構成する8種の生薬の個々の熱水抽出エキスをアジュバントとして経口投与し、経鼻接種インフルエンザワクチンに対するアジュバント活性を示すものの検索を行なった。その結果、生薬「半夏（ハンゲ）」の熱水抽出エキスが最も高いアジュバント活性を示すことを見い出した。更にハンゲの熱水抽出エキス中の有効成分の分離精製と構造解析を進め、特定の構造を持った化合物に強力な免疫増強活性を見い出して本発明を完成させた。すなわち、上記の課題を達成する手段は、以下の本発明のアジュバント、並びにこのアジュバントを用いたワクチン製剤により実現される。

【0013】

- (1) ヒドロキシ不飽和脂肪酸またはその誘導体を含むアジュバント。
- (2) ヒドロキシ不飽和脂肪酸またはその誘導体が、トリヒドロキシーモノエン構造を有する炭素数18の不飽和脂肪酸またはその誘導体である、(1)に記載のアジュバント。
- (3) トリヒドロキシーモノエン構造を有する炭素数18の不飽和脂肪酸または

その誘導体下記構造で示される 9S, 12R, 13S-トリヒドロキシ-10E-オクタデセン酸 (9S, 12R, 13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid) またはその誘導体である、(2) に記載のアジュバント。

【化 2】



[式中、R1 は水酸基、あるいは 1 個または 2 個のアルキル基またはアリール基が 1 個の酸素、硫黄、または窒素原子に結合した構造の置換基であり、R2、R3、および R4 は同一または異なってもよい水素、アルキル基、またはアシル基を示す。]

(4) ヒドロキシ不飽和脂肪酸が生薬より調製したヒドロキシ不飽和脂肪酸またはその誘導体である、(1) ~ (3) のいずれかに記載のアジュバント。

(5) (1) ~ (4) のいずれかに記載のアジュバントを構成成分とするワクチン製剤。

(6) ワクチン製剤中のアジュバントが免疫抗原成分と別に経口接種に用いられる、(5) に記載のワクチン製剤。

(7) ワクチン製剤中の免疫抗原成分が経鼻接種に用いられる、(6) に記載のワクチン製剤。

(8) 免疫抗原成分として、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、おたふくかぜウイルス、エイズウイルス、百日せき菌、ジフテリア菌、ヘリコバクター・ピロリ菌、出血性大腸菌 (EHEC)、クラミジア原虫、マイコプラズマ原虫、マラリア原虫、コクシジウム原虫、および住血吸虫で構成される群から選択される単一または複数の病原微生物の抗原を含む、(5) から (7) のいずれかに記載のワクチン製剤。

(9) ワクチン製剤中のアジュバントを免疫抗原成分と別に経口投与する、(5) に記載のワクチン製剤の投与方法。

(10) 免疫抗原成分を経鼻投与する、(9) に記載のワクチン製剤の投与方法。

法。

【0014】

なお、本発明において「アジュバント」とは、免疫系を刺激して、抗原に対する免疫反応を高める物質を指す。

【0015】

また、本発明において「アジュバントを構成成分とするワクチン製剤」といった場合には、アジュバントが免疫抗原成分などのワクチン製剤を構成しうる他の成分と混合されている場合のみならず、アジュバントが免疫抗原成分などのワクチン製剤を構成しうる他の成分と分離されている場合も含まれる。例えば、免疫抗原成分とアジュバントが別々の製剤として存在し、これらを別の経路で生体に投与する場合であっても、これらを併せてワクチン製剤と称する。

【0016】

本発明のアジュバントは、ヒドロキシ不飽和脂肪酸またはその誘導体であることを特徴とする。アジュバントとして用いるヒドロキシ不飽和脂肪酸は、好ましくは、水酸基が3個および二重結合1個を有する（即ち、トリヒドロキシモノエン構造を有する）炭素数18の一連の化合物である。このような化合物は、脂肪酸上に水酸基および二重結合を有する点において脂肪酸アジュバントとして新規である。脂肪酸鎖上に存在する水酸基および2重結合はカルボン酸に帰属される炭素を除くいずれの位置にあってもよい。また、水酸基が各々の炭素上に一個ずつ結合する場合には、水酸基はRもしくはSで表示される立体配置をとるがそのいずれの場合でもよい。さらに、二重結合に対する置換基の結合様式によりEもしくはZで表示される立体配置をとるが、この場合もいずれの立体配置をとってもよい。

【0017】

アジュバント活性発現のための望ましい水酸基および二重結合の位置およびその立体配置を例示するならば、水酸基ではその位置と立体配置が9S,12R,13Sであり、二重結合の位置およびその立体配置が10Eである。このような化合物としては、例えば、9S, 12R, 13S-トリヒドロキシ-10E-オクタデセン酸 (9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid) が含まれる。本化合物はCASの命名において

10-octadecenoic acid, 9,12,13-trihydroxy-, [9S-(9R*,10E,12S*, 13R*)]と記載される。公表された文献上、本化合物についてはアンジオテンシン変換酵素に対する阻害活性が報告されただけで、ワクチンにおけるアジュバント活性は報告されていない (M. Maruno, J. Traditional Medicines 14, 81-88, 1997)。

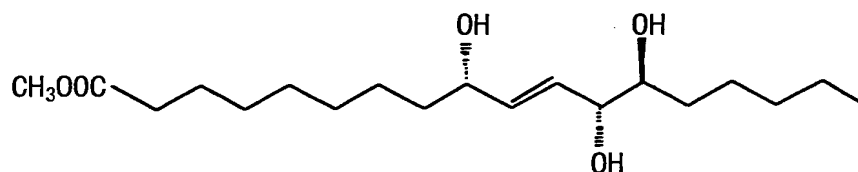
【0018】

本発明のアジュバントには、上記脂肪酸の水酸基ならびにカルボン酸部分のカルボニル基に種々の置換基が結合した誘導体が含まれる。その例としては、水酸基にはアセチル基、ベンゾイル基、ピルビン酸基、コハク酸基などのアシル基が結合したエステル誘導体が、また、エチル基やメチル基などのアルキル基が結合したエーテル誘導体があげられる。また、カルボン酸性カルボニル基に結合する置換基の例としては水酸基、エチルオキシ基などアルキルオキシ基、ベンジルオキシ基などアリールオキシ基、チオエチル基などチオアルキル基、またはチオアリール基、アミノ基、一級アミン、あるいは二級アミンなどが挙げられる。

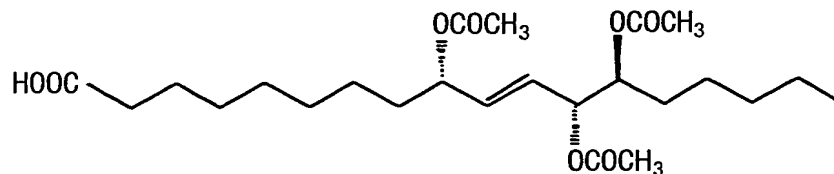
【0019】

具体的な化合物としては、例えば、

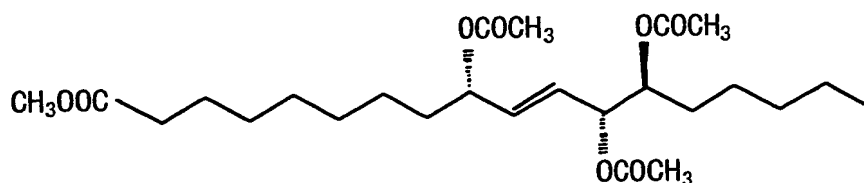
【化3】



【化4】



【化5】



が挙げられる。

【0020】

トリヒドロキシモノエン構造を有するヒドロキシ不飽和脂肪酸が強いアジュバント活性を有することは、公知の文献には記載が無く、本発明者らの長年の研究によって初めて明らかにされた新しい知見である。また、次のとおり、先行文献の記述からは予測されないことである。

【0021】

アジュバント活性を有する脂肪酸として構造が明らかとなっている化合物としては、リノール酸(linoleic acid)およびアラキドン酸(arachidonic acid)が公知である [H.K. Parmentier, M.G.B. Nieuwland, M.W. Barwegen, R.P. Kwakkel and J.W. Schrama, Poultry Science, 76 (8), 1164-1171, 1997; D.S. Kelley, P.C. Taylor, G.J. Nelson, P.C. Schmidt, B.E. Mackey and D. Kyle, Lipids, 32 (4), 449-456, 1997]。まず、リノール酸は炭素数18であるが、二重結合が2個のジエン酸である点で本発明の化合物と異なり、水酸基を持たない点でも本発明の化合物とは明確に区別される。アラキドン酸は炭素数20、二重結合が4個の脂肪酸であり、また水酸基を持たない点でも本発明の脂肪酸とは異なる。

【0022】

本発明のヒドロキシ不飽和脂肪酸が強いアジュバント活性を発揮するメカニズムは、現在不明である。但し、本発明者らは、漢方薬の小青竜湯を経口投与することにより、経鼻接種したインフルエンザワクチンに対して鼻腔中で抗インフルエンザウイルスIgA抗体価を上昇させるアジュバント活性を示すことを明らかにしている [T. Nagai, M. Urata and H. Yamada, Immunopharmacology and Immunotoxicology 18(2), 193-208, 1996]。さらに本発明者らは、小青竜湯の経口投与により腸管の粘膜免疫系の誘導組織であるパイエル板のTリンパ球が活性化さ

れ、鼻腔領域リンパ球中のインフルエンザウイルス特異的IgA抗体産生細胞数を増加させることを明らかにしている [H. Yamada and T. Nagai, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 20(3), 185-192, 1998; T. Nagai and H. Yamada, *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 20(2), 267-281, 1998]。粘膜免疫系には共通粘膜免疫機構が存在し、生体内のいずれかの粘膜免疫系が活性化されると、遠隔免疫により他の部位の粘膜免疫系も活性化されることが知られている。本発明のアジュバントであるヒドロキシ不飽和脂肪酸は、小青竜湯のアジュバント活性本体として同定されたものであることから、小青竜湯と同様に腸管粘膜免疫系を活性化することにより、鼻腔中での抗インフルエンザウイルスIgA抗体産生を促進し、アジュバント活性を示す可能性が考えられる。

【0023】

【発明の実施の形態】

ヒドロキシ不飽和脂肪酸の製造

本発明に用いる脂肪酸は、天然物、例えば動物組織、生薬などの薬用植物、海藻、微生物培養物などを原料として公知の方法を組み合わせ、抽出、分離、精製し、製造することができる。また合成化学的手段により製造することもできる。その例を示せば次の通りである。

【0024】

脂肪酸含有生薬であるハンゲ (*Pinellia ternata* Breit. のコルク層を除いた根茎) をメタノールあるいはアセトンなどの有機溶媒で抽出し、抽出液より溶媒を留去し、その残留物を含水メタノールに溶解し、これを n-ヘキサン、石油エーテル等の低極性溶媒で抽出した後、含水メタノール層から溶媒を留去し、その残留物を水、メタノール、エタノール、クロロホルム、エーテル、n-ヘキサン、ベンゼン、酢酸エチルから選ばれる少なくとも一つを溶出溶媒として、セファデックスLH-20などのセファデックス、ダイアイオンHP-20などの多孔性ポリマー、アルミナまたはシリカゲル等を担体に用いたカラムクロマトグラフィーに1回または複数回付し、薄層クロマトグラフィーで目的成分を確認しながら分画することにより得ることができる。また、ハンゲを水などで抽出後、その水抽出液をエ

タノール沈殿やダイアイオンHP-20などのような多孔性ポリマーによる分画ならびにシリカゲルカラムクロマトグラフィーなどにより精製してもよい。また場合によってはアセトン、メタノール、エタノール等の適当な溶媒を用いて再結晶することにより精製してもよい。

【0025】

さらに上記のようにして得られた化合物を必要に応じて、公知の化学的、または生物化学的、遺伝学的手法を適宜組み合わせてメチル化、エチル化、アセチル化やベンゾイル化し、種々の誘導体を作成できる。

【0026】

本発明の化合物の構造解析の方法としては、公知の方法 [W. Herz and P. Kulanthaivel, *Phytochemistry*, 24 (1), 89-91, 1985; S. Ohnuma, T. Uehara, T. Namai, M. Kodama, Y. Shiobara, *Chemistry Letters*, 577-580 (1986); M. Hamberg, *Lipids*, 26, 407-415 (1991)] を用いることができる。

【0027】

ワクチン

本発明によるアジュバントに基づいて、新規なワクチン製剤が提供される。本発明におけるワクチン製剤は、狭義と広義のワクチンを含む。すなわち、1) ヒト及び動物におけるウイルス、細菌、真菌、原虫、その他の微生物による感染症に有効な狭義のワクチンを含む。その一部を例示すれば、インフルエンザワクチン、百日せきワクチン、百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン、日本脳炎ワクチン、A型肝炎ワクチン、B型肝炎ワクチン、ロタワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻しん風しんおたふくかぜ混合ワクチン、麻しん風しん混合ワクチン、及びヘモフィルスインフルエンザワクチン等の各種ワクチンが挙げられる。さらには、多剤耐性黄色ブドウ状球菌 (MRSA) ワクチン、ヘリコバクターピロリ (以下H. ピロリと省略する) ワクチン、出血性大腸菌 (EHEC) ワクチン、サルモネラワクチン、クラミジアワクチン、マイコプラズマワクチン、エイズワクチン、マラリアワクチン、コクシジウムワクチン、あるいは住血吸虫ワクチンを含む。2) さらに広義のワクチンとして、がんワクチン、不妊ワクチン、胃潰瘍ワクチン、糖尿病ワクチン及び動脈硬化症ワクチンなど

非感染症の予防や治療に有効なワクチンを含む。

【0028】

これらのワクチンは製造方法により分類される種々のワクチンを含む。すなわち、弱毒化生ワクチン、不活化ワクチン、コンポーネントワクチン、DNAに基づくワクチンなどを含む。DNAに基づくワクチンの中には、プラスミドなどのキャリアに組み込んだDNA断片を含むワクチンのほか、リボザイムやアンチセンスオリゴヌクレオチドなどを併用するワクチンが含まれる。これらのワクチンは、治療用でも予防用でも良い。また、ワクチンの効果にとって有効な抗原成分を遺伝子組み換え技術を用いて組み換え生物細胞に生産させたものを用いる組み換えワクチンも含まれる。これらのワクチンは単味ワクチンでも混合ワクチンでも良い。これらのワクチンの製造方法や使用形態を例示すれば次の通りである。

【0029】

インフルエンザワクチン；発育鶏卵、または、ベロ細胞など動物細胞培養技術により増殖させたウイルスをエーテル、界面活性化剤などで分解精製して得られる、あるいは遺伝子組み換え技術や化学合成によって得られる赤血球凝集素（HA）、ノイラミニダーゼ（NA）、核蛋白質（NP）、マトリックス蛋白質（M）あるいはその一部などを含むスプリットワクチン、または、これらの蛋白質の遺伝子を含むDNA断片をふくむ経鼻接種用DNAワクチン。

【0030】

百日せきワクチン；百日せき菌を培養した培養液あるいは菌体より塩析、超遠心分離などを用いて抽出し、ホルマリンで無毒化した不活化ワクチン、または、遺伝子組み換え技術や変異剤処理で誘起した人工変異株生産物として得られる変異体の百日せき菌毒素（PT）、赤血球凝集素（FHA）、69K膜タンパク質、あるいは、その部分ペプチドなどを含むワクチン。

【0031】

百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン；百日せきワクチンにジフテリアトキシソイド（DT）および破傷風トキシソイド（TT）を混合した三種混合ワクチン。

【0032】

日本脳炎ワクチン；マウス脳内で増殖したウイルス、またはベロ細胞など動物

細胞培養技術により増殖したウイルスを超遠心分離あるいはエチルアルコールなどを用いてウイルス粒子を精製した後、ホルマリンで不活性化したもの、あるいは遺伝子組み換え技術や化学合成などによって得た抗原蛋白質を含むワクチン。

【0033】

B型肝炎ワクチン；B型肝炎キャリアの血液を原材料とし、塩析、超遠心分離を用いてHBs抗原を分離精製したプラズマワクチン、あるいは遺伝子組み換え技術や化学合成などによって得た抗原部位などを含む組み換えワクチン。

【0034】

麻しんワクチン；ニワトリ胚細胞などの培養細胞、またはベロ細胞など株化細胞培養技術により増殖させた弱毒ウイルス生ワクチン、あるいは、ウイルスの一部、または、遺伝子組み換え技術や化学合成によって得た感染防御抗原を含む組み換えワクチン。

【0035】

風しんワクチン；動物細胞またはヒト胎児細胞などの培養細胞、またはベロ細胞など株化細胞培養技術により増殖させたウイルス、あるいは、その一部、または、遺伝子組み換え技術や化学合成によって得た感染防御抗原を含むワクチン。

【0036】

おたふくかぜワクチン；家兎細胞などの培養細胞あるいは発育鶏卵で増殖させたウイルス、または、その一部、あるいは、遺伝子組み換え技術や化学合成によって得た感染防御抗原を含む弱毒生ワクチン。

【0037】

麻しん風しん混合ワクチン；麻しんワクチン、風しんワクチンを混合した二種混合ワクチン。

【0038】

麻しん風しんおたふくかぜ混合ワクチン；麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチンを混合した三種混合ワクチン。

【0039】

ロタワクチン；MA104細胞など培養細胞で増殖させたウイルス、または患者の糞便中より得たウイルス、または、その一部、あるいは遺伝子組み換え技術や化

学合成により得た感染防御抗原を含むワクチン。

【0040】

エイズワクチン；培養細胞で増殖させたウイルス、または患者より得たウイルス、または、その一部、あるいは遺伝子組み換え技術や化学合成により得た感染防御抗原を含むワクチン、あるいは有効なDNA断片を含むDNAワクチン。

【0041】

H. ピロリワクチン；培養したH. ピロリ菌体の破砕物、または、H. ピロリ培養物から分離したウレアーゼ、熱ショック蛋白質、トキシンなどを抗原とするワクチン、あるいは、遺伝子組み換え技術により生産されたこれらの抗原蛋白質からなる注射用あるいは経口、経鼻接種用ワクチン。

【0042】

アジュバントの使用形態

本発明のアジュバントをワクチンの有効成分として用いる使用形態は特に限定されない。すなわち、公知の種々の適切な使用形態が可能であり、物理的混合や抗原蛋白との化学的結合物でもよいし、リポソームなどのキャリアーに内包させてもよい。

【0043】

本発明のアジュバントは、公知のアジュバントの1種以上と同時に使用することができる。本発明のアジュバントと組み合わせるべき公知のアジュバントは、免疫原となる抗原の種類、接種する動物種、あるいは安全性等の考慮すべき条件に合わせて、好適な組み合わせを経験的に見い出すことができる。その結果、抗原の量を低下させたり、もう一方のアジュバントの量を低下させ、望ましくない副反応を低下させ、望ましい免疫反応を増強することができる。

【0044】

アジュバントの混合法

本発明のワクチン製剤は、上記免疫原と本発明のアジュバントをそれぞれ別々に調製するか、または所定の量比で混合することにより調製される。本発明のワクチン製剤は、ワクチン抗原（免疫抗原成分）と本発明のアジュバントをそれぞれ別々に調製、製剤化しておき、実施例に示す通り、別々に投与するか、または

、用時に混合してから接種するという方法によっても、効果を発揮させることができる。調製は厳密に無菌的に行なわなければならない。それぞれの原材料も完全に無菌的でなければならない。勿論、ワクチン作用以外に必要なないパイロジェンやアレルギー源となるような夾雑物質は可能な限り存在しない方が望ましい。その為に必要な方法は、この領域の専門家にとって公知である。

【0045】

アジュバントの量比

本発明によるワクチン製剤におけるワクチン抗原（免疫抗原成分）とアジュバントの量比としては、例えば1:0.0001~1:10,000（重量比）を例示することができる。この範囲はあくまでも一般的な範囲であり、ワクチンの種類に応じて好適な比率を決定して用いる。その為に必要な方法は、この領域の専門家にとって、公知である。

【0046】

ワクチンの性状

上記ワクチンは液状または粉末状で提供される。粉末状とする場合には、凍結乾燥等の手法により、粉末製剤とすることができる。液状製剤であれば、鼻腔内接種（鼻腔内スプレー、滴下、塗布など）、経口投与や注射に適している場合が多い。あるいは鼻腔内接種の場合は、粉末スプレー方式も可能である。また本発明によるワクチン製剤には、公知の安定剤や防腐剤を配合することができる。安定剤には、0.1~0.2%程度のゼラチンやデキストラン、0.5~1%のグルタミン酸ナトリウム、あるいは約5%の乳糖や約2%のソルビトール等が用いられる。防腐剤としては、0.01%程度のチメロサルや0.1%程度のβ-プロピオノラクトン、0.5%程度の2-フェノキシエタノールが公知である。

【0047】

ワクチン製剤の接種法

本発明によるワクチン製剤の使用方法は公知のどの方法も使用できる。

本発明のワクチン製剤においては、ワクチン抗原（免疫抗原成分）とアジュバント成分と混合して、全体として接種することもできるし、また、これら成分を別々に接種することもできる。接種は、好ましくは経口または経鼻で行われる。

これら成分を別々に接種する場合には、例えば、ワクチン抗原（免疫抗原成分）を経鼻接種し、アジュバント成分を経口投与しても、免疫増強効果を発揮させることができる。

【0048】

接種量はマウスの場合、鼻腔内で $5\mu\text{L}$ ～ $50\mu\text{L}$ 、経口で $0.05\sim 0.5\text{ mL}$ 、ヒトの場合は鼻腔内投与の場合は $0.1\sim 1.0\text{ mL}$ 、経口の場合は $1\sim 100\text{ mL}$ が好適である。これらの量は適宜変更し得る。また、免疫抗原との組み合わせについては、例えば、次に示す様な病原生物の免疫抗原では、ワクチン効果の点で、あるいは接種操作の点で、経鼻接種や経口接種が望ましいとされている。

【0049】

インフルエンザウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、おたふくかぜウイルス、エイズウイルス、百日せき菌、ジフテリア菌、H. ピロリ菌、出血性大腸菌(EHEC)、クラミジア、マイコプラズマ、マラリア原虫、コクシジウム原虫、および住血吸虫。

【0050】

これらのワクチン抗原（免疫抗原成分）は、単独で接種される場合もあるし、百日せき・ジフテリア・破傷風三種混合ワクチン、あるいは麻疹・風疹二種混合ワクチンのような形で同時接種の形を採用することもできる。経鼻接種や経口接種が望ましい理由は、いずれも気道や消化管の粘膜が感染ルートとなっているためである。感染ルートである局所粘膜における免疫機構を誘導するためには、それに適した免疫誘導活性の強いアジュバントが望ましい。あるいは、マラリア原虫ワクチンのように必ずしも十分な医療設備の期待できない地域で使用される機会が多いワクチンについては、医師や看護婦といった専門の技術者でなくても接種が可能な経鼻接種や経口接種といった接種ルートが望まれる。

以下、本発明の実施例を示すが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

【0051】

【実施例】

実施例 1. ヒドロキシ不飽和脂肪酸の調製 - 1

9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid は公開特許公報（特開平3-258775号公報、「脂肪酸化合物類および該脂肪酸化合物類を有効成分とする抗圧剤」）に記載される方法に準じて製造した。

【0052】

ハンゲ 1 kg をメタノールで加熱抽出し、抽出液から溶媒を減圧留去し、メタノールエキスを 21.2 g を得た。このメタノールエキスを 90% (v/v) メタノール-水混液 100 mL に溶解した後、分液ロートに移し、n-ヘキサン 50 mL を加えて軽く振り混ぜた後、静置した。下層を分取し、半量まで濃縮した後、これをダイアイオン HP-20（三菱化成製）カラムを用いた疎水性クロマトグラフィーに付し、最初に水、次いで 50% (v/v) メタノール-水混合液、最後にメタノールで溶出を行った。このメタノール溶出部 530 mg をセファデックス LH-20（アマシャムファルマシアバイオテク社製）カラムクロマトグラフィー、次いでシリカゲルを用いた順相カラムクロマトグラフィー、 μ -Bondapak C18（ウオーターズ社製）カラムを用いた逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて 9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を無色油状物質として得た。収量は 10 mg であった。本油状物質の $^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ のパターンを図 1 および 2 に各々示す。

【0053】

実施例 2. ヒドロキシ不飽和脂肪酸の調製-2

本発明の 9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid をハンゲの熱水抽出エキスから調製した実施例を示す。

【0054】

ハンゲ 500 g を水 10 L を用いて液量が半量となるまで煎出し、抽出液をろ取した。残渣については再度同様の方法により煎出し、抽出液を合わせて凍結乾燥することにより熱水抽出エキスを得た（収率：19.8%）。本熱水抽出エキスをメタノール 2.5 L を用いて還流し、メタノール可溶性画分と不溶性画分を得た。不溶性画分について同様の操作を 2 回繰り返した。メタノール不溶性画分を再度水に溶解後、4 倍容量のエタノールを加えて一晩攪拌した後、沈殿と上清を分取した。沈殿はさらに分子量排斥限界 10,000 のセルロース製透析膜を用いて蒸留水に対して透析し、その後透析内液を凍結乾燥することにより非透析性画分を得た（

収率：0.6%）。この非透析性画分を水で溶解し、ダイアイオンHP-20と共に攪拌後、ダイアイオンHP-20を水で洗浄することにより未吸着画分を除去した。ダイアイオンHP-20はさらに20% (v/v)、次いで80% (v/v)-メタノール-水混液で順次洗浄することにより吸着物質を溶出させた後、メタノールを用いて吸着画分を溶出させ、メタノール溶出画分を得た（収率：0.06%）。このメタノール溶出画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて繰り返し分画することにより本発明の 9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を得た。収量は 0.35 mgであった。

【0055】

また、ハンゲ熱水抽出エキスのメタノール還流で得られたメタノール可溶性画分（45.4 g）についても200mLのメタノール-水混液（9：1）で溶解後、等量のn-ヘキサンで振とう抽出し、下層を得た。この下層の溶媒を減圧留去後、80%メタノール-水混液中でダイアイオンHP-20と攪拌し、同溶媒でダイアイオンHP-20を洗浄することにより未吸着画分を除去した。さらにダイアイオンHP-20をメタノールを用いて溶出させることにより吸着画分を得た。本吸着画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより数回分画することにより本発明の9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid (1.2mg) を得た。

【0056】

ヒドロキシ不飽和脂肪酸がアジュバントとして有効であることを、公知の生物学的方法により確認した。ヒドロキシ不飽和脂肪酸が各種ワクチンに対し、抗体産生増強活性を有し、アジュバントとして有効であることを確認した実施例を以下に示す。

【0057】

実施例3．鼻腔内接種されたインフルエンザHAワクチンの一次免疫に対する抗体産生促進作用

精製インフルエンザウイルス（A/PR/8/34）よりエーテル処理によって脂質成分を除去してHAワクチン（タンパク質量として1 mg/mL）を調製した。実施例1に記載した方法で精製した 9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid の水性溶液を調製し、ヒドロキシ不飽和脂肪酸溶液とした。なお、ここで用いた 9

S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid の純度は、約95%以上であった。BALB/cマウス（雌性、7週齢）に本ヒドロキシ不飽和脂肪酸水溶液をマウスの体重当たり 50 $\mu\text{g/kg}$ の用量で5日間経口ゾンデを用いて胃内強制投与した。ヒドロキシ不飽和脂肪酸の経口投与開始3日目にマウスをアモバルビタルナトリウムで麻酔し、右側鼻腔にマイクロピペットで 10 μL のワクチンを滴下した。2週間後、マウスの眼底静脈叢より採血し、血清を調製した。血清中の抗インフルエンザウイルスIgA抗体価は酵素免疫測定法（ELISA）により測定した。血清は 20 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0）で平衡化したプロテインGセファロースカラム4FF（アマシャムファルマシアバイオテク社製）にのせ、カラムを 20 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0）で洗浄することにより未吸着画分を得た。

【0058】

抗インフルエンザウイルスIgA抗体の定量の際には、コーティング緩衝液（10 mM炭酸-重炭酸ナトリウム緩衝液 pH 9.6）に懸濁したHAワクチン（5 $\mu\text{g/ml}$ ）100 μL で、先ず96穴のEIAプレートの各孔（well）をコートした。室温に2時間放置後、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）- 0.05% ツィーン20でプレートを洗浄した。次に、非特異反応を抑制する目的で、ブロッキング溶液 [1%牛血清アルブミン（BSA）および0.1% NaN_3 を含むPBS] 300 μL で各孔をコートした。4℃に一晩放置後、PBS-ツィーン20で洗浄し、各孔に100 μL ずつブロッキング溶液で希釈した検査試料を加えた。抗インフルエンザウイルスIgA抗体の定量の際には、血清のプロテインGセファロースカラム未吸着画分を試料として用いた。室温に2時間放置後、PBS-ツィーン20でプレートを洗浄した。次に各孔にブロッキング溶液で希釈したアルカリホスファターゼ標識山羊抗マウスIgA α 鎖特異抗体（ザイメットラボラトリーズ社製）を100 μL ずつ加えた。室温に一晩放置後、PBS-ツィーン20で洗浄した。最後に、各孔に10%ジエタノールアミン緩衝液（pH 9.8）に溶解したp-ニトロフェニルリン酸（1 mg/mL；和光純薬工業株式会社製）を加えて発色させた。37℃で20～30分放置後、発色をマイクロプレートリーダーでO.D. (405 nm)を測定した。

【0059】

図3は 9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid の血清中の抗インフ

ルエンザウイルス抗体価に対する影響を示したものであるが、ワクチンを経鼻接種し、アジュバントを含まない水性溶媒を経口投与した場合には、低いレベルの抗体しか検出されなかった。しかし、9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を経口投与した場合、強く血清中の抗インフルエンザウイルスIgA抗体価を上昇させた。以上の結果は、9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid の経口投与により、経鼻接種したインフルエンザHAワクチンに対する血中での抗体産生が増強されることを示している。

【0060】

実施例4. インフルエンザHAワクチンの二次免疫に対する抗体産生促進作用

実施例3に記載した方法と同様にしてインフルエンザHAワクチンと 9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid の水性溶液を調製した。雌性、7週齢のBALB/cマウスに試料溶液をマウスの体重当たり50 μ g/kgの用量で5日間経口ゾンデを用いて胃内強制投与により経口投与した。9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid の経口投与開始3日目にマウスにアモバルビタールナトリウムを腹腔内投与して麻酔し、ワクチン10 μ Lをマウスに経鼻接種した。マウスを3週間飼育後、ワクチンのみをさらに二次経鼻接種した。さらに2週間飼育後、鼻腔洗液を調製した。鼻腔洗液は、マウスの左右の鼻腔より2 mLの0.1% BSAを含むPBSを灌流することによって回収した。鼻腔洗液中の抗インフルエンザウイルスIgA抗体価はELISAにより測定した。

【0061】

図4は 9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid の二次応答による鼻腔洗液中の抗インフルエンザウイルスIgA抗体産生に対する影響を示したものである。ワクチンを経鼻接種し、アジュバント無投与のときには、低いレベルの抗インフルエンザウイルスIgA抗体しか検出されなかった。これに対し9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を経口投与したグループでは強く鼻腔洗液中の抗インフルエンザウイルスIgA抗体価を上昇させた。

【0062】

次に、アジュバント特異的抗体 (IgG, IgA) およびIgEの検出を行った。ヒドロキシ不飽和脂肪酸とキャリアタンパク質である牛血清アルブミンとの結合物を

調製し、この溶液 ($1 \mu\text{g/ml}$) $100 \mu\text{l}$ で、先ず96穴のEIAプレートの各孔 (well) をコートした。次いで、非特異的反応を抑制する目的で、ブロッキング溶液 (5% スキムミルクを含むPBS) $300 \mu\text{l}$ でプレートの各孔を1時間コートした。その後、種々の濃度に希釈した検体 (鼻腔洗液) $100 \mu\text{l}$ を各孔に添加して1時間抗原抗体反応を行い、PBS-0.05% ツイーン20で3回洗浄した。これに二次抗体としてペルオキダーゼ標識抗マウスIgG、IgAまたはIgE抗体 (1:1000) $100 \mu\text{l}$ を添加して1時間反応させた。PBS-ツイーン20で3回洗浄後、基質溶液 (0.003% 過酸化水素水、ABTS 0.3mg/ml を含む0.1 M クエン酸緩衝液 pH4) $100 \mu\text{l}$ を加え、15分間インキュベートして発色させた。マイクロプレートリーダーを用いてO.D. (405nm) を測定した。その結果、ヒドロキシ不飽和脂肪酸を経鼻投与したマウスと投与していないコントロールマウスで、鼻腔洗液において吸光度に差は認められなかった。この結果より、アジュバント特異的抗体 (IgG, IgA) およびIgEは検出されなかった。

【0063】

上記のように、9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid により抗インフルエンザウイルスIgA抗体価が上昇した結果は、ワクチンの一次接種時に経口投与された 9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid が、ワクチンの二次接種による気道における抗体産生を強く誘導する作用があることを示している。即ち、9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid がHAワクチンに対するメモリー効果を強く誘導する作用があることを示している。用いたヒドロキシ脂肪酸は低分子化合物であることから予想されたとおり、免疫原性は低く、副反応惹起性が低いことが示唆された。

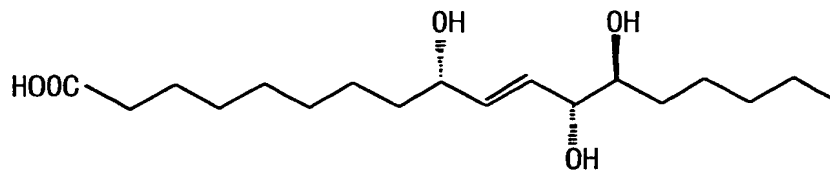
【0064】

実施例 5. ヒドロキシ不飽和脂肪酸の毒性

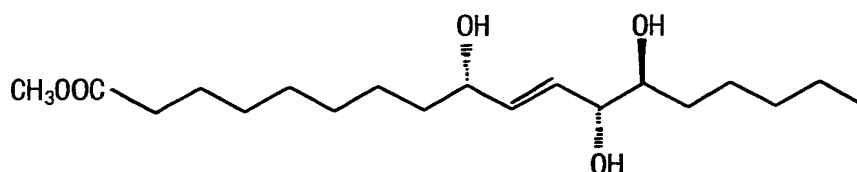
実施例1で調製したヒドロキシ不飽和脂肪酸 (1) (9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid)、およびこれから調製したメチルエステル誘導体 (2) (methyl 9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoate)、トリアセチル誘導体 (3) (9S,12R,13S-triacetoxy-10E-octadecenoic acid)、トリアセチルメチルエステル誘導体 (4) (methyl 9S,12R,13S-triacetoxy-10E-octadecenoate) をマウス

に投与し、急性毒性を調べた。(1)～(4)の化合物の化学構造式をそれぞれ化6～化9に示す。

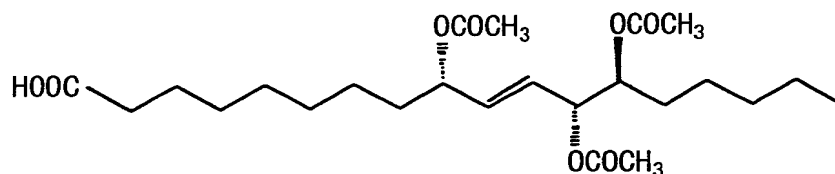
【化6】



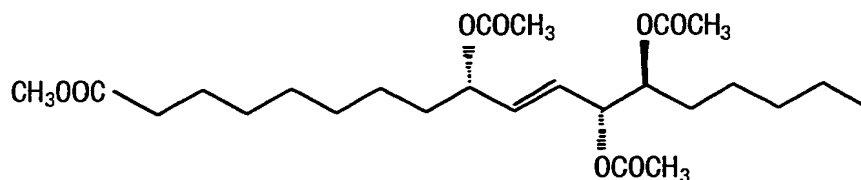
【化7】



【化8】



【化9】



【0065】

化合物(2) (methyl 9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoate) は、化合物(1) (9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid) をエーテルに溶解後、過剰量のジアゾメタン-エーテル溶液を加えて数分間室温で反応させた。反応溶液から溶媒を留去し(2)を得た。

【0066】

化合物(3) (9S,12R,13S-triacetoxy-10E-octadecenoic acid) は、化合物(1) (

9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid) を酢酸ナトリウム存在下、無水酢酸中で約1時間還流後、反応生成物をクロロホルム-水で分配抽出し、クロロホルム層より(3)を得た。

【0067】

化合物(1)より化合物(2)を合成後、(3)を合成する方法を用いて変換し、化合物(4) (methyl 9S,12R,13S-triacetoxy-10E-octadecenoate)を得た。

【0068】

(1)~(4)の化合物(純度95%以上)は30mg/kgの腹腔投与と100 mg/kgの経口投与において毒性の兆候を示さなかった。

【0069】

実施例 6. 百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン(経鼻) - ヒドロキシ不飽和脂肪酸(経口) 製剤

20 μ L中に百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンを蛋白質窒素として50 μ g含むように調製した。また、PBSに溶解し濾過滅菌した 9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid 10 μ gを0.5 mL中に含むように調製した。これらに防腐剤(0.005%チメロサル)を加え、容器に分注して、百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン(経鼻) - ヒドロキシ不飽和脂肪酸(経口) 接種剤とした。本品は10℃以下の冷暗所に保存した。

【0070】

上記のように調製した百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンをマウスの鼻腔内に接種し、9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid をその前後に経口投与した。さらに4週間後に同量のワクチンを追加接種し、抗体産生を調べた。試験成績から、百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンのみを接種された対照群のマウスでは、血中の抗百日せき毒素(PT) - IgG抗体は、156 ELISA単位、抗ジフテリアトキソイド(DT) - IgG抗体は、11 ELISA単位、抗破傷風トキソイド(TT) - IgG抗体は、13 ELISA単位であったのに対し、9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を併用経口投与したものでは、血中の抗PT-IgG抗体は、442 ELISA単位、抗DT-IgG抗体は、70 ELISA単位、抗TT-IgG抗体は、75 ELISA単位であった。また、百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンのみを接種された対照群の

マウスでは、鼻腔洗液中の抗PT-IgA抗体は、6 ELISA単位、抗DT-IgA抗体は、3 ELISA単位、抗TT-IgA抗体は、4 ELISA単位であったのに対し、9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を併用したワクチンでは、鼻腔洗液中の抗PT-IgA抗体は、14 ELISA単位、抗DT-IgA抗体は、11 ELISA単位、抗TT-IgA抗体は、11 ELISA単位であった。

【0071】

実施例 7. 麻しん風しん混合ワクチン（経鼻）－ヒドロキシ不飽和脂肪酸（経口）製剤

麻しん風しん混合ワクチンを、20 μ L中に各々のワクチン7 μ g相当量のウイルス粒子を含むように調製した。また、PBSに溶解し濾過滅菌した 9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を0.5 mL中に2.5 μ g含むように調製した。これらに安定剤（0.2%豚製ゼラチン、0.1%グルタミン酸ナトリウム、5%乳糖）を加え、容器に分注して、麻しん風しん混合ワクチン－ヒドロキシ不飽和脂肪酸点鼻、経口剤とした。本品は10℃以下の冷暗所に保存した。

【0072】

上記のように調製した麻しん風しん混合ワクチンを3週間隔で2回マウスに投与し、1回目の接種の前後にだけ 9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を経口投与して、血中の抗体産生をみた。試験成績から、ワクチンのみを接種した場合に産生されるELISA抗体価は麻しん、風しんのそれぞれは、0.14、0.09であったのに対し、9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid 併用ワクチンは、各々0.30、0.29であった。

【0073】

実施例 8. ロタワクチン－ヒドロキシ不飽和脂肪酸エステル製剤（経口、点鼻剤）の調製

20 μ L中にロタワクチン3.3 μ g相当量のウイルス粒子を含むように調製した。また、実施例5で用いたメチルエステル誘導体（2）（methyl 9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoate）をPBSに溶解し、0.5 mL中に10 μ g含むように調製し、濾過滅菌した。これを容器に分注して、ロタワクチン－ヒドロキシ不飽和脂肪酸経口、点鼻剤とした。本品は10℃以下の冷暗所に保存した。

【0074】

上記のように調製したロタワクチンを3週間隔で2回マウスに接種し、1回目の接種の前後にだけメチルエステル誘導体を経口投与して、血中の抗体産生をみた。試験成績から、ワクチンのみを接種した場合に産生されるELISA抗体価は、ワクチン点鼻接種の場合、0.089であったのに対し、メチルエステル誘導体併用ワクチンは、0.38であり、また、ワクチンも経口接種の場合、アジュバント無接種対照群マウスでは0.018であったのに対し、メチルエステル誘導体添加ワクチン接種群では、0.27であった。

【0075】

実施例9. マイコプラズマワクチン-ヒドロキシ不飽和脂肪酸製剤（点鼻、経口剤）の調製

20 μ L中にマイコプラズマワクチン 2.0×10^{10} CFU（コロニー形成単位）相当量のウイルス粒子を含むように調製した。また、PBSに溶解し濾過滅菌した 9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を0.5 mL中に10 μ g含むように調製した。これらを容器に分注して、マイコプラズマワクチン-ヒドロキシ不飽和脂肪酸製剤点鼻、経口剤とした。本品は10℃以下の冷暗所に保存した。

【0076】

上記のように調製したマイコプラズマワクチンを2週間隔で3回マウスに経鼻投与し、1回目の接種の前後にだけ 9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を経口投与して、マイコプラズマ感染攻撃後病変をみた。試験成績から、ワクチンのみを投与された対照群のマウスは10匹すべてに病変が認められたのに対し、9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を併用したものでは10匹当たり3匹のみに病変が認められた。病変数の平均値では、ワクチンのみでは302であったのに対し、9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid 併用ワクチンでは178であった。

【0077】

【発明の効果】

以上の実施例により、本発明の効果として、次のことが明らかである。

1. ヒドロキシ不飽和脂肪酸で構成される本発明のアジュバントは、経口投与

することにより経鼻接種したインフルエンザHAワクチン等に対する抗体産生を増強する。

2. 本発明のアジュバントを経口投与し、ワクチン抗原を鼻腔ルートで接種すると、血中の抗体産生と共に局所（鼻腔洗浄液）の抗体産生も増強される。すなわち、本発明のアジュバントを使用することによって、ワクチン抗原の接種量を減少させることができ、副反応の軽減につながる。

3. ヒドロキシ不飽和脂肪酸の毒性は低く、また免疫原性も低いので、本発明のアジュバントを併用するワクチンは、安全性の高いワクチンである。

【0078】

以上に説明したように、本発明によるアジュバントを構成成分とするワクチン製剤は、ワクチンによるウイルスおよび細菌感染の予防あるいは治療に有効な薬剤として期待される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明のアジュバント、9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid の¹H-NMRのパターンを示す図である。図中の「CD₂HOD」は溶媒由来のシグナルを示す。

【図2】

本発明のアジュバント、9S,12R,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid の¹³C-NMRのパターンを示す図である。図中の「CD₂HOD」は溶媒由来のシグナルを示す。

【図3】

本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを用いたものを経鼻接種したときの血清中の一次抗体産生の結果を示すグラフである。図中、縦軸は抗体価（ELISA単位）を、横軸は使用したアジュバントの種類を示す。

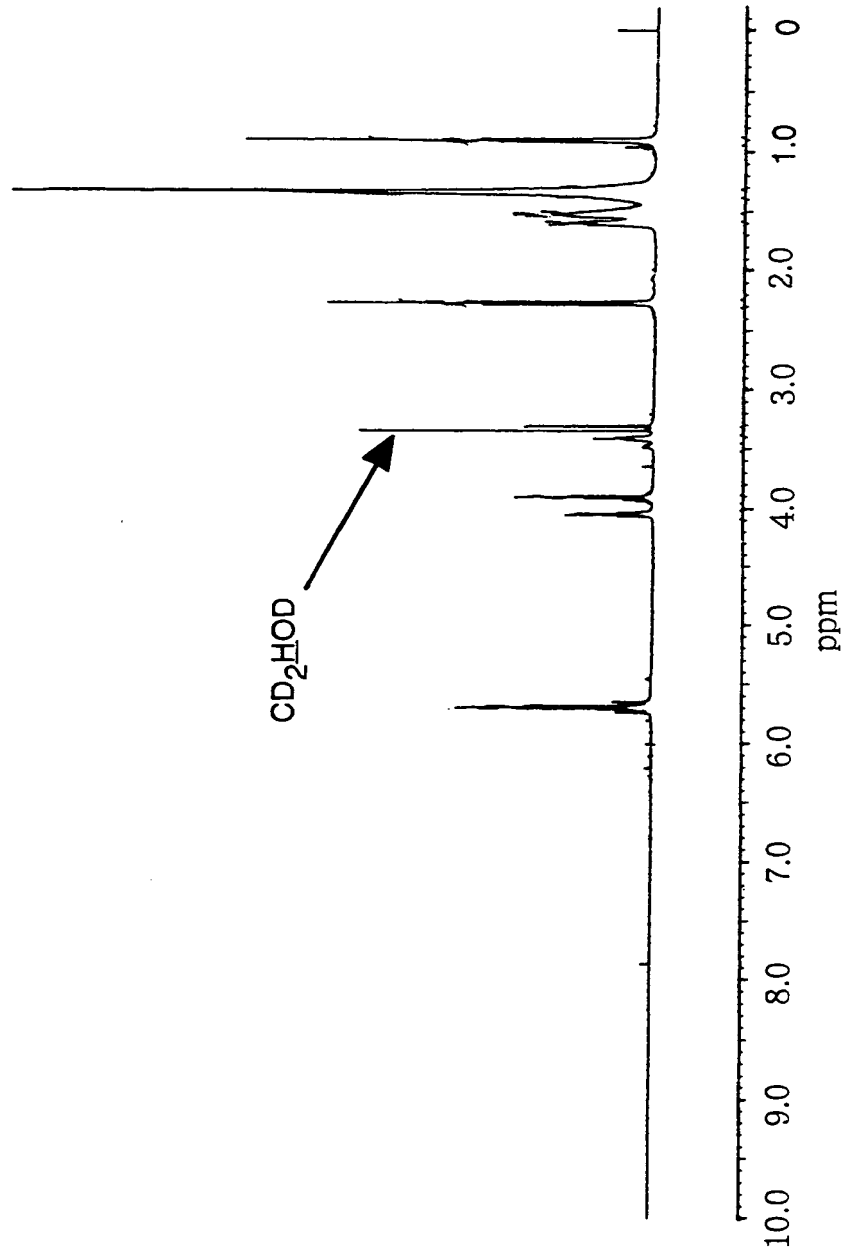
【図4】

本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを用いたものを経鼻接種したときの鼻腔洗浄液中の二次抗体産生の結果を示すグラフであ

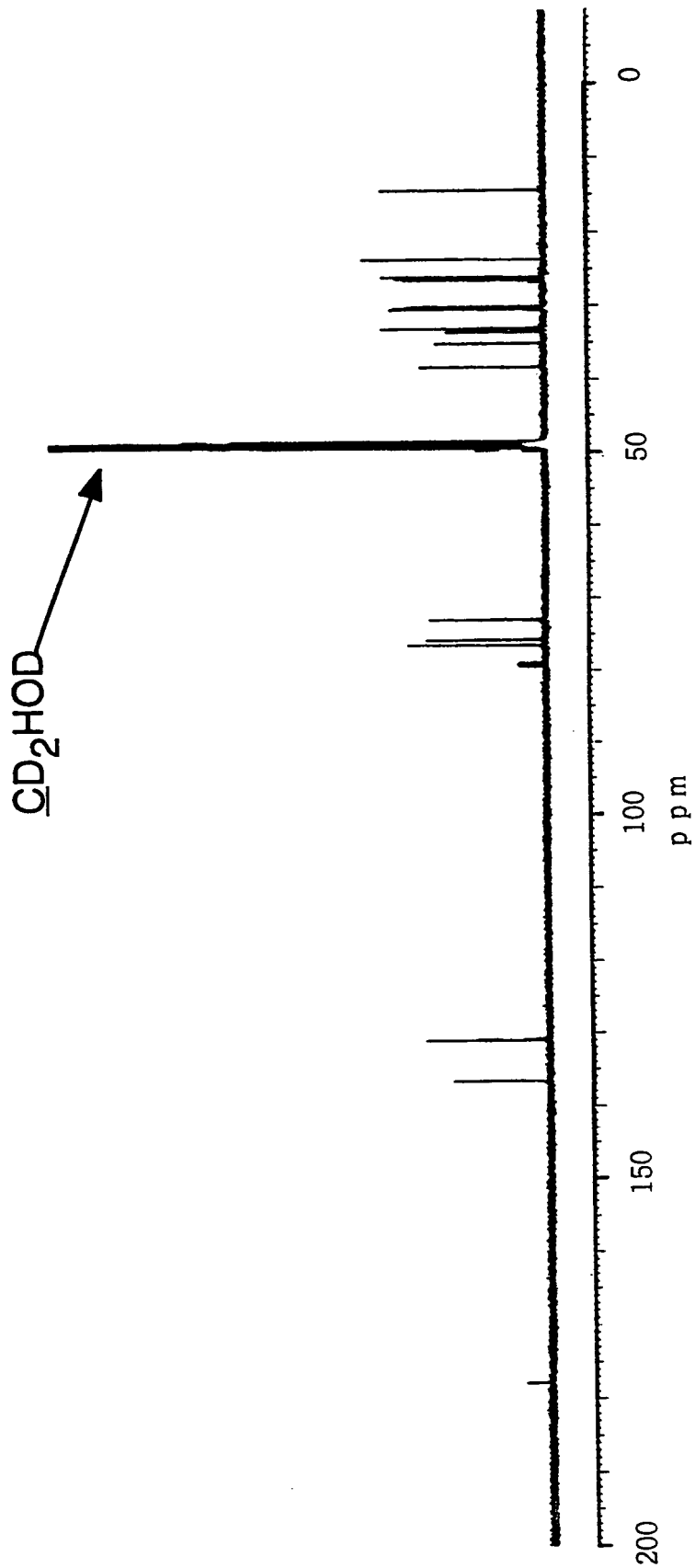
る。図中、縦軸は抗体価（ELISA単位）を、横軸は使用したアジュバントの種類を示す。

【書類名】 図面

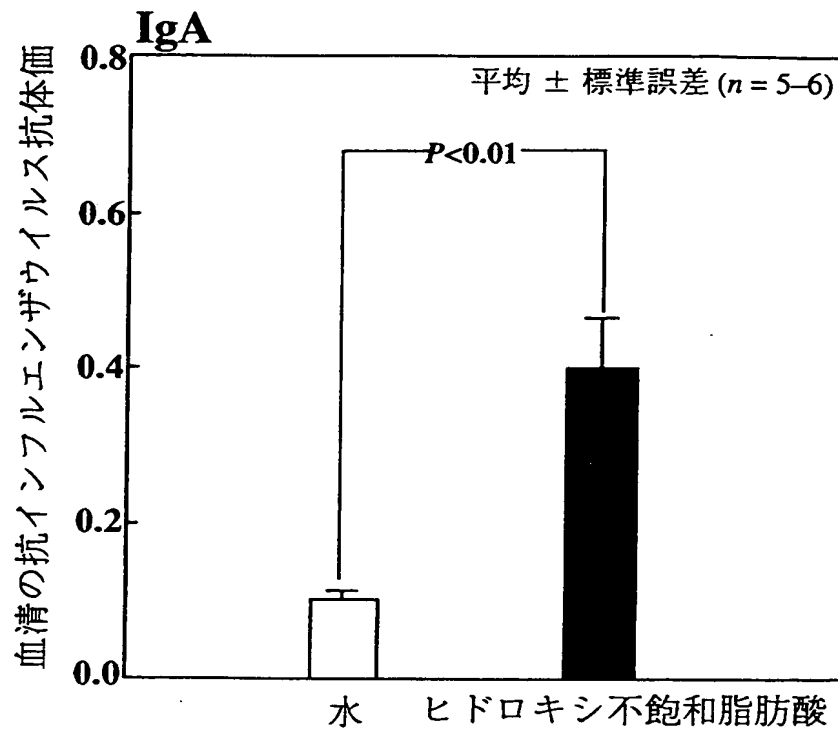
【図 1】



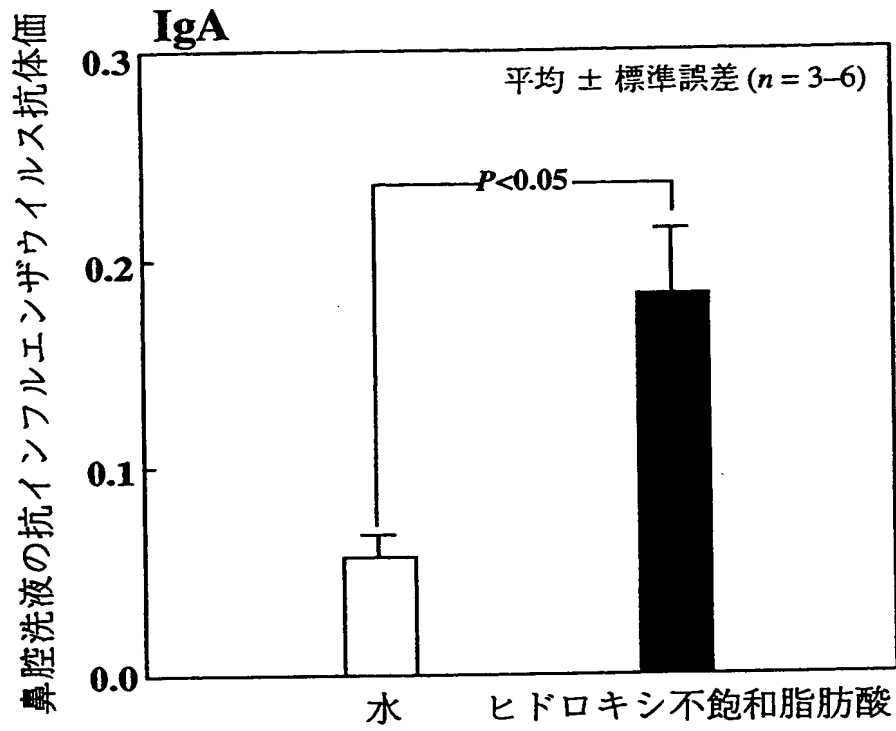
【図 2】



【図3】



【図4】

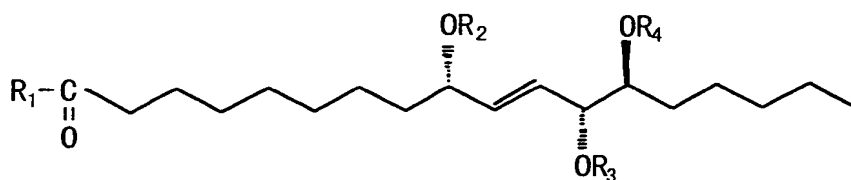


【書類名】 要約書

【課題】 本発明は、免疫増強性と安全性に優れたアジュバントと、このアジュバントを用いたワクチンの提供を課題とする。

【解決手段】 ヒドロキシ不飽和脂肪酸を含むアジュバント、並びにこのアジュバントを構成成分とするワクチンにより前記課題を解決する。例えば下記の構造を有するヒドロキシ不飽和脂肪酸の投与により、十分な免疫増強性を示すワクチンを提供する。

【化 1】



【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[390027214]

1. 変更年月日	1992年 4月 3日
[変更理由]	名称変更
住 所	東京都港区白金5丁目9番1号
氏 名	社団法人北里研究所